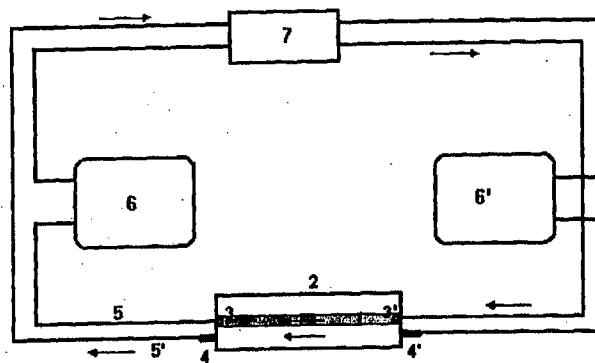




<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61L 27/38</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/37123</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 2000 (29.06.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/04102</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Dezember 1999 (17.12.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 60 286.3 21. Dezember 1998 (21.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CELL-LINING GESELLSCHAFT FÜR ZELLKULTIVIERUNG MBH [DE/DE]; Rudower Chaussee 29, D-12489 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAULITSCHKE, Manrico [DE/DE]; Schonensche Strasse 29, D-13189 Berlin (DE). RADEMACHER, Axel [DE/DE]; Mellenseestrasse 25, D-10319 Berlin (DE). SITTINGER, Michael [DE/DE]; Karl-Marx-Strasse 147d, D-15831 Grossziethen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, D-10315 Berlin (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>

(54) Title: CARDIOVASCULAR PROTHESES WITH A STABLE ENDOTHELIAL CELL SURFACE

(54) Bezeichnung: KARDIOVASKULÄRE PROTHESEN MIT STABILER ENDOTHELZELL-OBERFLÄCHE



(57) Abstract

The invention relates to cardiovascular prostheses with a stable, confluent endothelial cell surface which is produced by proliferation under a shearing stress. Said cardiovascular prostheses are produced by means of a novel method for creating a stable confluent endothelial cell monolayer. The inventive cardiovascular prostheses ensure markedly improved bonding of the cells on the surface of the prosthesis and hereby enable the monolayer to be obtained even over long periods and in more demanding shearing stress conditions. The invention hereby provides the first means of significantly reducing the risk of coagulation compared to non-covered prostheses which are not confluent lined with endothelial cells and prostheses which have not been confluent populated but whose cells do not bond sufficiently on the surface.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft kardiovaskuläre Prothesen mit stabiler, durch Proliferation unter Scherstress erzeugter konfluenter Endothelzell-Oberfläche, die durch ein neuartiges Verfahren zur Ausbildung eines stabilen konfluenten Endothelzellmonolayers geschaffen werden. Die erfindungsgemässen kardiovaskulären Prothesen erzielen eine deutlich verbesserte Haftung der Zellen auf der Oberfläche der Prothese und ermöglichen somit den Erhalt des Monolayers auch langfristig und unter erhöhten Scherstressbedingungen. Damit wird erstmalig eine deutliche Reduzierung des Gerinnungsrisikos im Vergleich zu unbeschichteten, nicht konfluent mit Endothelzellen ausgekleideten Prothesen wie auch zu Prothesen, die konfluent besiedelt wurden, aber eine unzureichende Haftung der Zellen auf der Oberfläche aufweisen, erreicht.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Kardiovaskuläre Prothesen mit stabiler Endothelzell-Oberfläche

Beschreibung

Die Erfindung betrifft kardiovaskuläre Prothesen mit stabiler, durch Proliferation unter Scherstress erzeugter konfluenter Endothelzell-Oberfläche, die durch ein neuartiges Verfahren zur Ausbildung eines stabilen konfluenten Endothelzellmonolayers geschaffen werden. Unter dem Begriff kardiovaskuläre Prothesen werden dabei Gefäß- und Herzklappenprothesen verstanden, die blutkontaktseitig mit Endothelzellen beschichtet werden.

Verfahren zur blutkontaktseitigen Auskleidung von kardiovaskulären Prothesen mit Endothelzellen sind bekannt, auch solche, bei denen das Erreichen eines konfluenten Endothelzellmonolayers durch Wachstum der Zellen unter statischen Bedingungen nach initialer subkonfluenter Besiedlung oder durch eine direkte konfluente Besiedlung der isolierten Zellen (US-Patent 5334879) erfolgt. Dabei kann die Besiedlung unter schrittweiser und/oder permanenter Rotation wie auch statisch vorgenommen werden.

Implantate aus Zellkulturen können auch mittels einer resorbierbaren Trägerstruktur nach Ummantelung der Zellen (DE 43 06 661) sowohl als 3-dimensionales als auch als 2-dimensionales Implantat hergestellt werden, wobei verschieden erzeugte Trägermaterialien möglich sind (WO 94/17841). In der Schrift EP 320 441 wird ein Verfahren zum Konditionieren von mit lebenden Zellen beschichteten Kunststoffträgern beschrieben - die Anpassung an einen Scherstress soll erreicht werden. Dabei wird ein zeitlich unterbrochener Medienstrom verwendet - ein permanenter Scherstress wirkt nicht ein. Es handelt sich hierbei um die Konditionierung des mit Zellen konfluent belegten Trägers und eine Gewöhnung der abgelagerten Zellen an den Scherstress, nicht um eine Adaption der Zellen bereits während ihres Teilungs- und Anheftungsprozesses.

Der Eintrag von Scherkräften ist auch Gegenstand der Schrift WO 93/01843. Es werden hiernach jedoch nur Scherkräfte sehr geringer Größe, vor allem aber radialer Orientierung, eingetragen. Dabei erfolgt das Ansiedeln der Zellen unter statischen Bedingungen, bei einer 4-fachen Rotation der Prothese alle 20 min um jeweils 90°C, und erst danach wird ein permanenter Scherstress sehr geringer Größe durch Rotation auf einem Roller (10 U/min) erzeugt.

Über die Bildung eines geschlossenen Zellmonolayers berichtet die Offenlegungsschrift WO 94/25584. Dieser wird sofort bei der Ansiedlung erzeugt. Die initiale Adhäsion findet unter statischen Bedingungen statt. Danach erfolgt über mehr als 24 h die Inkubation des konfluent ausgesäten Monolayers, auch hier erfolgt die Anpassung der Zellen an physiologische Größen von Scherstress nicht während der Proliferation der Zellen. Im US-Patent 5634879 wird über ein Verfahren berichtet, das eine direkte Aussaat der Zellen auf die Prothese nach der Isolation vorsieht, ohne das Ziel zu verfolgen, eine Anpassung der Zellen an einen erhöhten definierten Scherstress zu erhalten. Dabei werden die Zellen durch eine transversale Fil-

tration der Suspension durch das Prothesenmaterial hindurch auf die innere Oberfläche aufgebracht. Eine geschlossene Kreislaufperfusion liegt nicht vor. Es erfolgt auch keine Proliferation unter definierten Strömungsbedingungen.

Der Nachteil der beschriebenen Erfindungen besteht darin, dass entweder das Proliferationsverhalten der Zellen unter statischen Bedingungen, bedingt durch eine veränderte Genexpression, eine verminderte Haftung der Zellen auf der Prothesenoberfläche zur Folge hat oder in vitro keine Bedingungen simuliert werden, die denen der in vivo Situation entsprechen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, kardiovaskuläre Prothesen zu entwickeln, mit denen sich den genannten Nachteilen begegnen lässt.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, dass in kardiovaskulären Prothesen mit Endothelzell-Oberfläche nach einer initial subkonfluenten Besiedlung der blutkontaktseitigen Oberfläche die Ausbildung eines konfluenten Monolayers erfolgt. Das geschieht durch Wachstum der Zellen unter permanenter Einwirkung von bis auf physiologische Werte ansteigenden definierten pulsatischen Scherkräften mittels Umströmung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse in einem inneren Perfusionskreislauf und einer Benetzung der Prothesenaußenwand in einem äußeren Perfusionskreislauf bzw. durchströmbaren Medienreservoir.

Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination aus bekannten (Verfahren zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers auf der Oberfläche von kardiovaskulären Prothesen) und neuen Elementen (Anpassung der Endothelzellen an einen im Blutgefäßsystem lokal am Implantationsort vorhandenen hämodynamischen Scherstress), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass der hämodynamische Scherstress direkten Einfluss auf Struktur und Funktion der Endothelzellen nimmt und damit bereits während ihres Wachstums (Zellteilungsphase) Einfluss auf die Bildung eines konfluenten Endothelzellmonolayers bewirkt.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass während der Ausbildung des konfluenten Endothelzellmonolayers durch Zellteilung die Zellpopulation bereits an Wandschubspannungen, wie sie in vivo zu beobachten sind, adaptiert wird, mit der Folge einer stabilen Haftung der Zellen auf der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche, welche für die langfristige strukturelle und funktionelle Wirksamkeit des Endothelzellmonolayers als Grenzschicht zwischen Prothesenoberfläche und dem strömenden Blut von entscheidender Bedeutung ist. Damit wird der Aufbau einer neuartigen Prothesenoberfläche erreicht, die vergleichbar mit der in vivo Auskleidung von Blutgefäßen ist und daraus folgend eine deutliche Reduzierung des Gerinnungsrisikos im Vergleich zu unbeschichteten oder nicht konfluent mit Endothelzellen ausgekleideten Prothesen erreicht wird. Bereits bekannte Verfahren sind durch eine initiale und unter statischen Bedingungen erfolgende Besiedlung der Prothesenoberfläche gekennzeichnet, die nur kurzfristig und diskontinuierlich zum Austausch des Mediums unterbrochen

wird (EP 0 320 441). Bekannt sind des weiteren Verfahren, in denen die Einstellung der Adhärenz der Zellen auf der Prothesenoberfläche immer mit der Ausbildung der unmittelbaren Konfluenz (WO 93/01843) einhergeht. Es erfolgt daher keine Proliferation der Endothelzellen unter permanentem Einwirken von definierten pulsatischen Scherkräften (WO 94/2584).

5 Die Erfindung gestattet u.a. eine Adaption der Zellen an verschiedene Wandschubspannungen unter Berücksichtigung der später im Implantat lokal auftretenden Scherkräfte in Abhängigkeit vom Implantationsort bereits vor der Implantation der Prothese in den Blutkreislauf.

Die ansteigenden Scherkräfte können mittels einer programmgesteuerten Pumpeinrichtung
10 (7) erzeugt werden. Die mathematische Größe der ansteigenden Scherkräfte kann variabel und zeitlich unabhängig gewählt werden. Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung lassen sich die mathematische Größe und der Endwert der Scherkräfte adäquat den physiologischen Bedingungen des Implantationsorts frei und zeitvariabel über eine Programmsteuerung wählen und ermöglichen damit die Ausbildung sowohl arterieller als auch venöser Gefäßprothesen (1)
15 entsprechend der unterschiedlichen, in vivo auftretenden Wandschubspannungen und die Anpassung an pulsatile Strömungsbedingungen.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung kann die mathematische Größe der auftretenden Scherkräfte sowohl durch Variation der Pumpleistung als auch durch Variation der Größe des Querschnittes der verwendeten Pumpschläuche oder anderer Verbindungselemente
20 außerhalb der Kammer sowie durch die geometrische Form und Ausführung der Kammer selbst eingestellt werden.

Der äußere Perfusionskreislauf (5') kann gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung im Gleich- oder Gegenstrom zum inneren Perfusionskreislauf (5), aber auch statisch betrieben werden. Beide Perfusionskreisläufe (5,5') können auch als nicht geschlossenes System arbeiten; sie führen gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung von einem Medienreservoir
25 (6) in ein anderes Medienreservoir (6'), in dem das Medium, das die Prothese bereits durchströmt hat, aufgefangen wird. Dabei können beide Kreisläufe auch innerhalb der Kammer (2) nach Umströmung der Prothesenoberfläche zusammengeführt werden.

Innerer und äußerer Perfusionskreislauf können verschiedene Reservoirs oder ein und dasselbe Medienreservoir (6, 6') besitzen. Die Prothese kann sich im Medienreservoir selbst befinden, und dadurch können innerer und äußerer Perfusionskreislauf miteinander verbunden werden.
30

Die sich an die Besiedlung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche anschließende Ausbildung eines konfluenten Endothelzellmonolayers erfolgt mittels eines Perfusionskreislaufs, dargestellt in Figur 1 und Figur 2. Er besteht aus einem inneren Perfusionskreislauf zur
35 Umströmung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse im Inneren einer Perfusionskammer, wobei die Prothese mittels Adapter im Innenraum der Perfusionskammer befestigt und ausgerichtet wird und somit selbst einen Teil des inneren Perfusionskreislaufs bildet sowie aus einem äußeren Perfusionskreislauf zur äußeren Umströmung

der Gefäßprothese in derselben Perfusionskammer, welche nach außen hin für beide Kreisläufe Verbindungen zu einer Pumpeinrichtung sowie zu den steril auswechselbaren Medienreservoirs, welche auch als Druckausgleichsbehälter fungieren, aufweisen.

Der äußere Perfusionskreislauf dient der Benetzung der Prothesenaußenseite, um ihr Austrocknen zu verhindern. Das Prothesenmaterial ist häufig von hoher Porösität und kann vor der Zellaussaat mit Fibrin oder anderen adhäsionsfördernden Substanzen durchtränkt werden. Eine optionale Perfusion verhindert den Aufbau möglicher Gradienten sowohl in der Medienzusammensetzung als auch des pH-Wertes an der und/oder durch die Prothesenwandung. Damit wird eine gradientenabhängige transversale Diffusion durch das Prothesenmaterial hindurch verhindert.

Die Erfindung bezieht sich mithin auf durch ein neuartiges Verfahren erzeugte kardiovaskuläre Prothesen, gekennzeichnet durch die Ausbildung eines stabilen konfluenten Endothelzellmonolayers auf der blutkontaktseitigen Oberfläche der Prothesen. Dabei erfolgt sowohl die initiale Besiedlung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche als auch das sich anschließende Wachstum der Endothelzellen zu einem konfluenten Monolayer unter dem permanenten Einfluss von Scherstress, welcher in zwei Etappen erzeugt wird: anfangs in der Besiedlungsphase zur Erzeugung eines subkonfluenten Endothelzellmonolayer durch die axiale Rotation der Kulturkammer sowie anschließend durch die Umströmung der Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse. Damit werden in vitro auf der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche Bedingungen geschaffen, die vergleichbar mit der in vivo Situation sind. Daraus folgend wird eine konfluente Endothelzellschicht mit hoher Qualität gebildet.

Diese neuartigen kardiovaskulären Prothesen erzielen eine deutlich verbesserte Haftung der Zellen auf der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche und ermöglichen somit den Erhalt des Monolayers auch langfristig und unter erhöhten Scherstressbedingungen. Damit wird erstmalig eine deutliche Reduzierung des Gerinnungsrisikos im Vergleich zu unbeschichteten, nicht konfluent mit Endothelzellen ausgekleideten Prothesen wie auch zu Prothesen, die konfluent besiedelt wurden, aber eine unzureichende Haftung der Zellen auf der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche aufweisen, erreicht. Dieses Verfahren eignet sich für die Beschichtung sowohl von Herzklappen und Gefäßprothesen, wie sie in der kardiovaskulären Chirurgie zur Anwendung kommen, als auch von Stents.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht darin, dass nach einer initial subkonfluenten Besiedlung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche die Ausbildung eines konfluenten Monolayers durch Wachstum der Zellen unter permanenter Einwirkung von bis auf physiologische Werte ansteigenden definierten pulsatischen Scherkräften mittels Umströmung der Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse in einem inneren Perfusionskreislauf und einer Benetzung der Prothesenaußenwand in einem äußeren Perfusionskreislauf oder in einem durchströmbaren Medienreservoir erfolgt.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

5 Eine Polytetrafluorethylen-Bypass-Prothese (Fig. 1: 1) mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Länge von 15 cm wird mit Hilfe der Adapter (Fig. 1: 3,3'), die als Olive, Kegel mit Spannvorrichtung oder Spreizvorrichtung ausgebildet sind, am Innenraum der Perfusionskammer (Fig. 1: 2) befestigt und somit mit dem inneren Perfusionskreislauf (Fig. 1: 5) verbunden. Die pulsatile Strömung (0 – 3.500 ml/h Endothelzellkulturmedium) wird über eine
10 Peristaltikpumpe, die von Hand oder programmgesteuert frei und zeitvariabel geregelt werden kann (Fig. 1: 7), erzeugt. Über die Schlauchanschlüsse (Fig. 1: 4,4'), die dezentral an den Seiten der Perfusionskammer angebracht sind, wird mit Silikonschläuchen der äußere Perfusionskreislauf (Fig. 1: 5') hergestellt, der im Gleichstrom zum inneren Kreislauf perfundiert wird. Die beiden Perfusionskreisläufe (Fig. 1: 5,5') verfügen jeweils über ein Reservoir (Fig.
15 1: 6,6'), das Endothelzellkulturmedium enthält und gleichzeitig als Druckausgleichsbehälter fungiert. Die Peristaltikpumpe (Fig. 1: 7) wird über Computer so gesteuert, dass die über eine pulsatile Strömung eingetragenen Scherkräfte in der Prothese über einen Zeitraum von 10 h von 0,01 auf 2,5 dyn/cm² ansteigen. Danach bleiben die Strömungsbedingungen bis zum Tag der Implantation konstant.

20 Anschließend wird die Kammer in steriler Umgebung geöffnet, und die konfluent mit Zellen beschichtete Prothese kann implantiert werden.

Beispiel 2:

Eine Dacron[®]-Bypass-Prothese (Fig. 1: 1) mit einem Durchmesser von 5 mm und einer
25 Länge von 10 cm wird mit Hilfe der Adapter (Fig. 1: 3,3') am Innenraum der Perfusionskammer (Fig. 1: 2) befestigt und somit mit dem inneren Perfusionskreislauf (Fig. 1: 5) verbunden. Die pulsatile Strömung (0 – 7.000 ml/h Endothelzellkulturmedium) wird über eine Peristaltikpumpe, die von Hand oder programmgesteuert frei und zeitvariabel geregelt werden kann (Fig. 1: 7), erzeugt. Der äußere Perfusionskreislauf wird (Fig. 1: 5') mit Medium gefüllt und
30 statisch betrieben. Die beiden Perfusionskreisläufe (Fig. 1: 5,5') verfügen über ein gemeinsames Reservoir, das Endothelzellkulturmedium enthält und gleichzeitig als Druckausgleichsbehälter dient. Verwendung finden hierbei expandierbare Blutbeutel der Materialien Ethylenvinylacetat-M (EVAM) oder Polyvinylchlorid (PVC).

Die Peristaltikpumpe (Fig. 1: 7) wird über Computer so gesteuert, dass die über eine
35 pulsatile Strömung eingetragenen Scherkräfte in der Prothese über einen Zeitraum von 24 h von 0,01 auf 5 dyn/cm² ansteigen. Danach bleiben die Strömungsbedingungen bis zum Tag der Implantation konstant.

Anschließend wird die Kammer in steriler Umgebung geöffnet, und die konfluent mit Zellen beschichtete Prothese kann implantiert werden.

Beispiel 3:

Eine Polytetrafluorethylen-Gefäßprothese (Fig. 1: 1) mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Länge von 12 cm wird mit Hilfe eines Adapters im Innenraum des Medienreservoirs, das somit den äußeren Perfusionskreislauf darstellt, befestigt. Die pulsatile Strömung (0 – 7.000 ml/h Endothelzellkulturmedium) wird über eine Peristaltikpumpe, die von Hand oder programmgesteuert frei und zeitvariabel geregelt werden kann (Fig. 1: 7), erzeugt, wobei der Innendurchmesser der Pumpschläuche variabel ist. Die Peristaltikpumpe (Fig. 1: 7) wird über Computer so gesteuert, dass die über eine pulsatile Strömung eingetragenen Scherkräfte in der Prothese über einen Zeitraum von 24 h von 0,01 auf 5 dyn/cm² ansteigen. Danach bleiben die Strömungsbedingungen bis zum Tag der Implantation konstant.

Anschließend wird die Kammer in steriler Umgebung geöffnet, und die konfluent mit Zellen beschichtete Prothese kann implantiert werden.

Beispiel 4:

Eine Polytetrafluorethylen-Bypass-Prothese (Fig. 1: 1) mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Länge von 4 cm wird mit Hilfe der Adapter (Fig. 1: 3,3'), die als Olive, Kegel mit Spannvorrichtung oder Spreizvorrichtung ausgebildet sind, am Innenraum der Perfusionskammer (Fig. 1: 2) befestigt und somit mit dem inneren Perfusionskreislauf (Fig. 1: 5) verbunden. Die pulsatile Strömung (0 – 3.500 ml/h Endothelzellkulturmedium) wird über eine Peristaltikpumpe, die von Hand oder programmgesteuert frei und zeitvariabel geregelt werden kann (Fig. 1: 7), erzeugt. Über die Schlauchanschlüsse (Fig. 1: 4,4'), die dezentral an den Seiten der Perfusionskammer angebracht sind, wird mit Silikonschläuchen der äußere Perfusionskreislauf (Fig. 1: 5') hergestellt, der im Gegenstrom zum inneren Kreislauf perfundiert wird. Hierbei erfolgt die Perfusion eines oder beider Kreisläufe in einem nicht geschlossenen System. Dabei strömt Medium von einem als Vorrat dienenden Medienreservoir in ein anderes, als Auffangbehälter dienendes Reservoir.

Die Peristaltikpumpe (Fig. 1: 7) wird über Computer so gesteuert, dass die über eine pulsatile Strömung eingetragenen Scherkräfte in der Prothese über einen Zeitraum von 10 h von 0,01 auf 2,5 dyn/cm² ansteigen. Danach bleiben die Strömungsbedingungen bis zum Tag der Implantation konstant.

Anschließend wird die Kammer in steriler Umgebung geöffnet, und die konfluent mit Zellen beschichtete Prothese kann implantiert werden.

Beispiel 5:

Eine Herzklappenprothese (Fig. 1: 1) wird mit Hilfe eines Adapters (Fig. 1: 3) am Innenraum der Perfusionskammer (Fig. 1: 2) befestigt und somit mit dem inneren Perfusionskreislauf (Fig. 1: 5) verbunden. Die pulsatile Strömung (0 – 7.000 ml/h Endothelzellkulturmedium) wird über eine Peristaltikpumpe, die von Hand oder programmgesteuert frei und zeitvariabel

geregelt werden kann (Fig. 1: 7), erzeugt. Der äußere Perfusionsschleife wird (Fig. 1: 5') im Gleichstrom perfundiert. Nach Umströmung der Herzklappenprothese vereinigen sich beide Perfusionsschleifen im Inneren der Kammer (2) bis zum Verlassen derselben. Die beiden Perfusionsschleifen (Fig. 1: 5,5') verfügen über ein gemeinsames Reservoir, das Endothelzellkulturmedium enthält und gleichzeitig als Druckausgleichsbehälter dient. Verwendung finden hierbei expandierbare Blutbeutel der Materialien Ethylenvinylacetat-M (EVAM) oder Polyvinylchlorid (PVC).

Die Peristaltikpumpe (Fig. 1: 7) wird über Computer so gesteuert, dass die über eine pulsatile Strömung eingetragenen Scherkräfte in der Prothese über einen Zeitraum von 24 h von 0,01 auf 5 dyn/cm² ansteigen. Danach bleiben die Strömungsbedingungen bis zum Tag der Implantation konstant.

Anschließend wird die Kammer (2) in steriler Umgebung geöffnet, und die konfluent mit Zellen beschichtete Prothese kann implantiert werden.

Figuren

Figur 1 zeigt den schematischen Aufbau eines geschlossenen Perfusionssystems. Hauptelement bildet die Kammer (2), die über die Schlauchanschlüsse (4,4') zum inneren Kreislauf (5) als auch zum äußeren Kreislauf (5') mit der Pumpeinrichtung (7) sowie den zugehörigen Medienreservoir (6,6') verbunden ist. Der innere Kreislauf wird durch die über die Adapter (3,3') in der Kammer fixierte Gefäßprothese (1) geschlossen. Die dargestellten Pfeile symbolisieren die Strömungsrichtung des perfundierenden Mediums, wobei in dieser Darstellung eine Perfusion beider Kreisläufe in Gleichstrom erfolgt.

Figur 2 zeigt den schematischen Aufbau eines Perfusionssystems gemäß Figur 1, jedoch erfolgt hier die Perfusion nicht mittels zweier geschlossener Kreisläufe, sondern von einem Medienreservoir (6) in ein anderes Medienreservoir (6'), in dem das Medium, das die Prothese bereits durchströmt hat, aufgefangen wird.

Bezugszeichen

- 1 - kardiovaskuläre Prothese
- 2 - Kammer
- 3,3' - Adapter
- 4,4' - Schlauchanschluss
- 5 - innerer Kreislauf
- 5' - äußerer Kreislauf
- 6,6' - Medienreservoir
- 7 - Pumpe

Patentansprüche

1. Kardiovaskuläre Prothesen mit Endothelzell-Oberfläche, herstellbar dadurch, dass nach
5 einer initial subkonfluenten Besiedlung der blutkontaktseitigen Oberfläche die Ausbildung eines konfluenten Monolayers durch Wachstum der Zellen unter permanenter Einwirkung von bis auf physiologische Werte ansteigenden definierten pulsatischen Scherkräften mittels Umströmung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse in einem inneren Perfusionskreislauf und einer Benetzung der Prothesenaußenwand in einem äußeren Perfusionskreislauf oder in einem durchströmbaren Medienreservoir erfolgt.
2. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ansteigenden Scherkräfte mittels einer programmgesteuerten Pumpeinrichtung (7) erzeugt werden.
- 15 3. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die mathematische Größe der ansteigenden Scherkräfte variabel und zeitlich unabhängig gewählt werden kann.
- 20 4. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die mathematische Größe und der Endwert der Scherkräfte adäquat den physiologischen Bedingungen des Implantationsorts frei und zeitvariabel über eine Programmsteuerung gewählt werden können.
- 25 5. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mathematische Größe der auftretenden Scherkräfte sowohl durch Variation der Pumpleistung als auch durch Variation der Größe des Querschnittes der verwendeten Pumpschläuche oder anderer Verbindungselemente außerhalb der Kammer sowie durch die geometrische Form und Ausführung der Kammer selbst eingestellt werden kann.
- 30 6. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 1 bis 5, herstellbar mittels eines Perfusionskreislaufs, bestehend aus einem inneren Perfusionskreislauf (5) zur Umströmung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse im Inneren der Kammer (2), wobei die Prothese (1) mittels Adapter (3,3') im Innenraum befestigt wird und
35 somit selbst den inneren Perfusionskreislauf (5) bildet sowie einem äußeren Perfusionskreislauf (5') zur äußeren Umströmung der Prothese (1) in derselben Kammer (2), welche nach außen hin für beide Kreisläufe (5,5') Verbindungen zu einer Pumpeinrichtung (7) sowie den Medienreservoir (6,6'), welche auch als Druckausgleichsbehälter fungieren, aufweist.

7. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 1 bis 6, herstellbar mittels eines Perfusionskreislaufts, bestehend aus einem inneren Perfusionskreislauf (5) zur Umströmung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse im Inneren der Kammer (2), wobei die Prothese (1) mittels eines Adapters (3,) im Innenraum befestigt wird und somit selbst den inneren Perfusionskreislauf (5) bildet sowie einem äußeren, sich mit dem inneren Perfusionskreislauf (5) nach Umströmen der Prothese (1) im Inneren der Kammer (2) vereinigenden Perfusionskreislauf (5') zur äußeren Umströmung der Prothese (1) in derselben Kammer (2), welche nach außen hin für beide Kreisläufe (5,5') Verbindungen zu einer Pumpeinrichtung (7) sowie den Medienreservoir (6,6'), welche auch als Druckausgleichsbehälter fungieren, aufweist.
8. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass der äußere Perfusionskreislauf (5') im Gleich- oder Gegenstrom zum inneren Perfusionskreislauf (5), aber auch statisch betrieben werden kann.
9. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Perfusionskreisläufe von einem Medienreservoir (6) in ein anderes Medienreservoir (6') führen, in dem das Medium, das die Prothese bereits durchströmt hat, aufgefangen wird.
10. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass innerer und äußerer Perfusionskreislauf verschiedene Medienreservoir (6,6') besitzen.
11. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Prothese sich im Medienreservoir selbst befindet und dadurch innerer und äußerer Perfusionskreislauf miteinander verbunden sind.
12. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Medienreservoir (6,6') aus expandierbaren Blutbeuteln der Materialien PVC oder EVAM bestehen.
13. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausführung der Adapter (3,3') zur Befestigung der Prothese (1) als Olive, Kegel mit Spannvorrichtung oder als Spreizelement möglich ist.
14. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6, 7 und 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Länge der einzuspannenden Prothese durch die konstruktive Auslegung mindestens eines Abschlussteils mit dem Adapter (3 oder 3') der Kammer (1) variiert werden kann.

15. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (2) aus einem durchsichtigen Material gefertigt wird.

5 16. Kardiovaskuläre Prothesen nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass als Prothese eine Gefäßprothese, eine Herzklappenprothese oder ein Stent verwendet wird.

10 17. Verfahren zur Beschichtung von kardiovaskulären Prothesen mit Endothelzellen nach Anspruch 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass nach einer initial subkonfluenten Besiedlung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche die Ausbildung eines konfluenten Monolayers durch Wachstum der Zellen unter permanenter Einwirkung von bis auf physiologische Werte ansteigenden definierten pulsatischen Scherkräften mittels Umströmung der blutkontaktseitigen Prothesenoberfläche längs der Prothesenhauptachse in einem inneren Perfusionskreislauf und einer Benetzung der Prothesenaußenwand in einem äußeren Perfusionskreislauf oder in einem durchströmbaren Medienreservoir erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass

a) die ansteigenden Scherkräfte mittels einer programmgesteuerten Pumpeinrichtung (7) erzeugt werden.

20 b) die mathematische Größe der ansteigenden Scherkräfte variabel und zeitlich unabhängig gewählt werden kann

c) die mathematische Größe und der Endwert der Scherkräfte adäquat den physiologischen Bedingungen des Implantationsorts frei und zeitvariabel über eine Programmsteuerung gewählt werden können

25 d) die mathematische Größe der auftretenden Scherkräfte sowohl durch Variation der Pumpleistung als auch durch Variation der Größe des Querschnittes der verwendeten Pumpschläuche oder anderer Verbindungselemente außerhalb der Kammer sowie durch die geometrische Form und Ausführung der Kammer selbst eingestellt werden kann.

30 19. Verfahren nach Anspruch 17 und 18, dadurch gekennzeichnet, dass in einem inneren Perfusionskreislauf (5) zur Durchströmung des Protheseninnenraums längs der Prothesenhauptachse im Inneren der Kammer (2) die Prothese (1) mittels Adapter (3,3') im Innenraum befestigt wird und somit selbst den inneren Perfusionskreislauf (5) bildet und dass ein äußerer Perfusionskreislauf (5') zur äußeren Umströmung der Prothese (1) in derselben Kammer (2), welche nach außen hin für beide Kreisläufe (5,5') Verbindungen zu einer Pumpeinrichtung (7) sowie den Medienreservoir (6,6'), welche auch als Druckausgleichsbehälter fungieren, vorhanden ist.

35

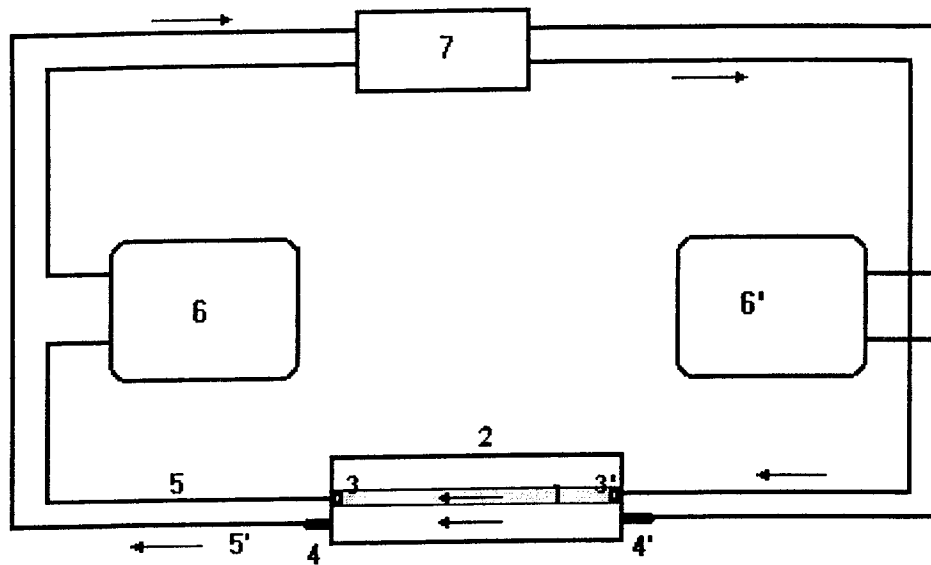
20. Verfahren nach Anspruch 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) der äußere Perfusionskreislauf (5') im Gleich- oder Gegenstrom zum inneren Perfusionskreislauf (5), aber auch statisch betrieben werden kann
- b) beide Perfusionskreisläufe (5,5') nicht als geschlossenes System arbeiten, sondern von einem Medienreservoir (6) in ein anderes Medienreservoir (6') führen, in dem das Medium, das die Prothese bereits durchströmt hat, aufgefangen wird
- c) innerer und äußerer Perfusionskreislauf verschiedene Medienreservoirs oder ein und dasselbe Medienreservoir (6,6') besitzen
- d) beide Perfusionskreisläufe (5,5') sich nach Umströmen der Prothese (1) in Inneren der Kammer (2) vereinigen, aber in getrennten Perfusionskreisläufen (5,5') die Kammer (2) verlassen.

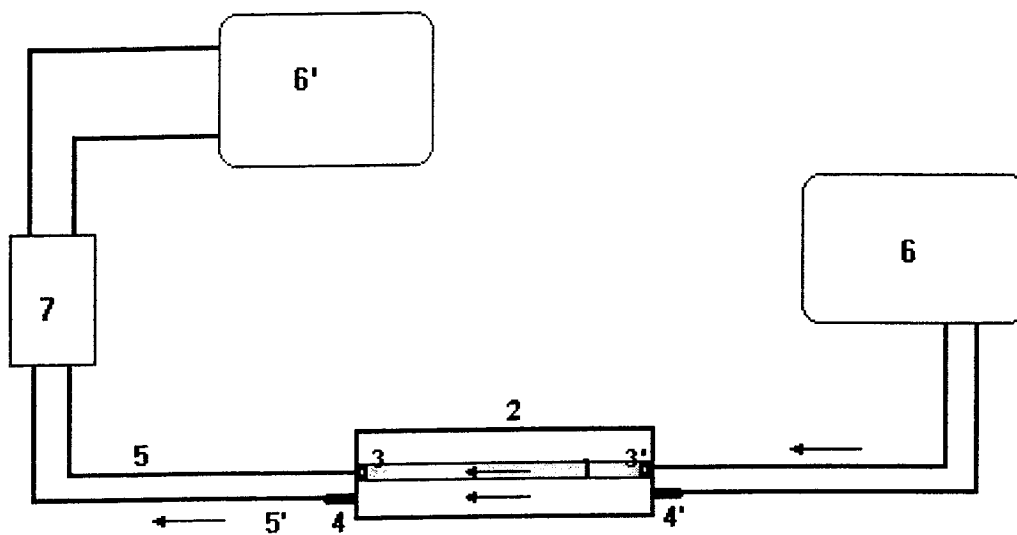
21. Verfahren nach Anspruch 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Prothese sich im Medienreservoir selbst befindet und dadurch innerer und äußerer Perfusionskreislauf miteinander verbunden sind.

1 / 1

Figur 1



Figur 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/04102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61L27/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L A61F C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 49799 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 31 December 1997 (1997-12-31) page 3, line 1 - line 14 ----	1-16
X	EP 0 320 441 A (SULZER AG) 14 June 1989 (1989-06-14) cited in the application column 1, line 31 - column 2, line 43 claim 1 ----	1-16
X	WO 93 01843 A (UNIV LEICESTER) 4 February 1993 (1993-02-04) cited in the application claims 1-3,7,9 -----	1-16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2000

Date of mailing of the international search report

20/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heck, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/04102

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9749799 A	31-12-1997	US 5792603 A AU 3581797 A CA 2261027 A EP 0927245 A	11-08-1998 14-01-1998 31-12-1997 07-07-1999
EP 0320441 A	14-06-1989	CH 675679 A AT 66581 T DE 3864500 A JP 2140159 A JP 2657081 B	31-10-1990 15-09-1991 02-10-1991 29-05-1990 24-09-1997
WO 9301843 A	04-02-1993	AU 2361792 A	23-02-1993

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61L27/38

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61L A61F C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 49799 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 31. Dezember 1997 (1997-12-31) Seite 3, Zeile 1 - Zeile 14 ---	1-16
X	EP 0 320 441 A (SULZER AG) 14. Juni 1989 (1989-06-14) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Zeile 31 - Spalte 2, Zeile 43 Anspruch 1 ---	1-16
X	WO 93 01843 A (UNIV LEICESTER) 4. Februar 1993 (1993-02-04) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-3, 7, 9 -----	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heck, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter. Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/04102

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9749799	A	31-12-1997	US	5792603 A	11-08-1998
			AU	3581797 A	14-01-1998
			CA	2261027 A	31-12-1997
			EP	0927245 A	07-07-1999
EP 0320441	A	14-06-1989	CH	675679 A	31-10-1990
			AT	66581 T	15-09-1991
			DE	3864500 A	02-10-1991
			JP	2140159 A	29-05-1990
			JP	2657081 B	24-09-1997
WO 9301843	A	04-02-1993	AU	2361792 A	23-02-1993